

1. 研究課題名：健康リスク予知予防の為の分子生物学的新技法の開発
2. 研究機関：(財)体質研究会
3. 研究者：菅原 努
4. 共同研究者：小野公二、伴 貞幸、丹羽太貴、鈴木啓司、加納永一、二階堂修
5. 要約

最近の分子細胞生物学の成果を活用して健康リスク予知予防の為のバイオマーカーを開発することを目指した。従来は癌化、老化などについて、DNA 損傷とそれに基づく体細胞突然変異を指標することが行われている。これに対し本計画では環境因子に対する細胞のストレス応答に着目し、分担研究者が夫々得意とする手法を用いてその可能性を探った。その結果、細胞の種々のストレス応答が見出され、その健康リスクへの関与の可能性が示唆された。これを実用的なバイオマーカーにするには、更に一段の工夫が必要である。また従来モデルとの対比において、現時点においてこれを否定することは出来ず、先づ放射線を例として高線量と低線量を対比しながら作用機構については新たなパラダイムの確立が必要であるとの結論に達した。このように新しい体系の大略を示すことが出来たのが、付随的な大きな成果である。

Development of new molecular biological technique for predicting and preventing health risks

Health Research Foundation, Pasteur Bldg. 5F, 103-5 Tanaka-Monzen-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan
Tsutomu Sugahara

Abstract

Our project was planned to propose biomarkers for predicting and preventing health risk by applying recent development of molecular and cellular biology. Currently, DNA damages and resulting somatic mutations have been assured to play a major roles in aging and carcinogenesis. Contrarily in the present project, stress response to environmental stimuli has been analyzed as a possible biomarker. Seven cell biologists have contributed by using their own materials and methods to analyze stress response.

Several new stress responses in mammalian cells were found and their possible application as a biomarker was suggested. But further study is needed to apply them in clinical use. In addition, low dose (cGy) radiobiology in contrast to the current radiobiology primarily based on high dose (Gy) effects was proposed. A new project to establish the low dose radiobiology as a new paradigm should be initiated as soon as possible.

6. 研究の背景

21 世紀での健全な社会を築く為には、この 20 世紀に見られたような公害などのあと追いでなく、広く健康リスクを総合的に評価して諸々の施策が立てられなければならない。健康リスクについては今までいくつか統計的なデータはあるが、これからはそれらを予知予防できるようにすることが必要である。その為最近の分子細胞生物学の進歩を活用するとともに、複雑系としての人間を理解したうえで、老化、癌化などの予知予防の新しい技法を開発しようとするものである。

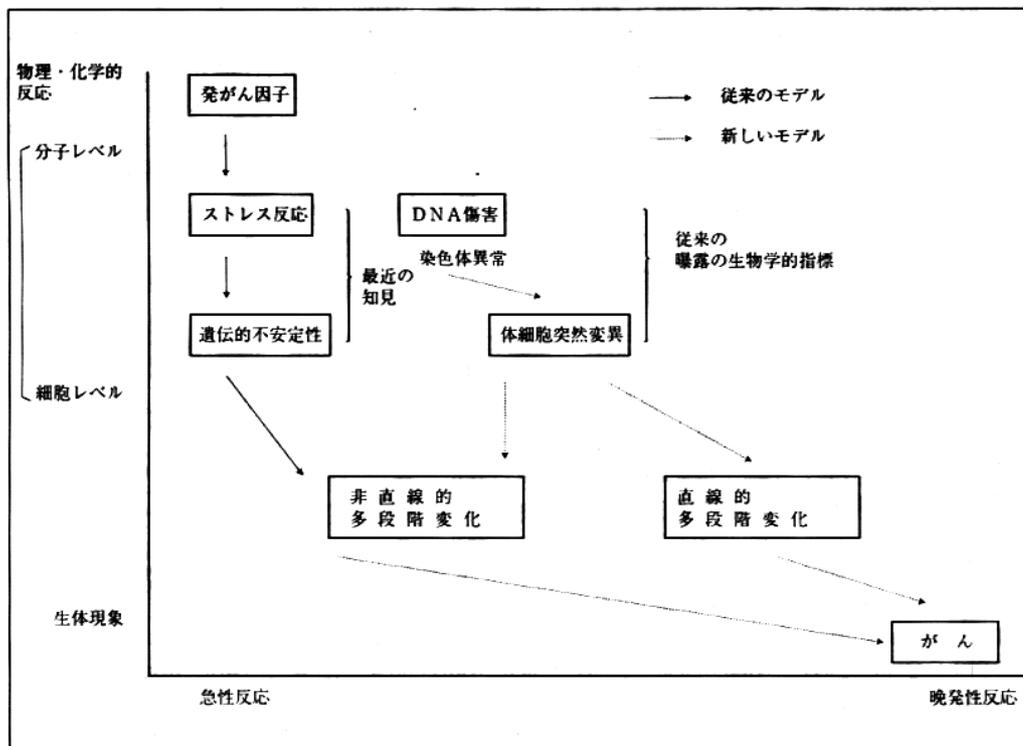
7. 研究の目的

発ガンの過程については、従来のモデルでは DNA 損傷とその修復—突然変異—がんと考えられ、環境発がん因子のターゲットは DNA であるとされてきた。これに対し低線量放射線の影響の研究に端を発し、放射線などの外的因子が先ず細胞にストレスとして働き、細胞はこれを受けてストレス反応を起こすことが示されてきた。このストレス反応と癌化、老化との関係は未だ明らかではないが、これが引き金になって一連のがん化の突然変異が生じ、がんに至るといふ過程が考えられる。

言い換えれば、上記の従来のモデルは最近の生物学的知見から見ると多くの矛盾点を含んでおり、新しいモデルの構築が期待されている。そこで細胞に見られるこれらのストレス反応とこれに続く遺伝的不安定性を詳しく解析すると共に、それとがん化、老化との関連について検討し、それらから健康リスクを予知予防する手段を見出す。(概念図参照)

概念図

発がん機構についての2つのモデル



8. 材料と方法

8-1. 研究実施体制：以下のような体制のもとに分担し、3 回の研究打合せ会を通じてまとめていく。

菅原 努	(財)体質研究会 環境因子による発がん機構のモデル化と研究の総括
小野公二	京大・原子炉実験所教授 Miconucleus Assay による DNA 損傷の検索と高発がん個体群の検出の可能性に関する研究
伴 貞幸	(財)放射線影響研究所副主任研究員 ミトコンドリアゲノムの不安定性とそれのヒト細胞老化への関与
丹羽太貴	広島大・原爆放射能医学研究所教授 放射線で誘発される遺伝的不安定性の解析
鈴木啓司	長崎大・薬学部助手 細胞癌化過程におけるテロメラーゼ制御機構の役割
加納永一	福井医大・放射線基礎医学教授 温熱・紫外線・放射線による Nitric oxide synthase の誘導
二階堂修	金沢大・薬学部放射線薬品化学教室 各種ストレスで誘導される細胞内タンパクの分離と精製、およびその遺伝的不安定性誘導における意義の解明

8-2. 研究実施の経緯

平成 8 年 1 月 16 日	研究契約開始
1 月 24 日	第 1 回研究打合せ会於イメリタスクラブ会議室
4 月 28 日	研究計画概要の説明於長崎伊王島
6 月 19 日	長崎テクノポリス財団への中間報告於イメリタスクラブ会議室
7 月 31 日	第 2 回研究打合せ会於イメリタスクラブ会議室
11 月 7 日	研究報告概要発送長崎テクノポリス財団宛
11 月 30 日	第 3 回研究打合せ会於京都パークホテル
12 月 9 日	成果報告書発送長崎テクノポリス財団宛

9. 結果

実験的な研究としては、細胞のストレス反応の特性の追求と新しいストレス反応の検出、遺伝的不安定性の解析及び細胞不死化の問題に大別される。二階堂らは放射線などのストレスによるアポトーシス誘導を指標にして、その誘導に関与する蛋白の分離精製を行い、またこれに関連してアポトーシスを起した細胞とのみ特異的に反応するモノクローナル抗体の産生に成功した。

加納らは温熱 (44C, 15min)、X 線 (1Gy) によつて iNOS (マクロファージ、血管平滑

筋細胞、血管内皮細胞に存在し、細菌性毒素やサイトカインにより発現誘導される NO 合成酵素)が蓄積誘導されることを示した。ただし、実験に用いたヒト神経膠芽腫 2 種のうち、T98G では顕著に見られたが A-172 では殆ど見られないという大きな差があったことが注目された。その原因として p53 遺伝子の正常型と変異型の差によることを明らかにした。この点ヒトの末梢リンパ球の適応応答でも responder と non responder とがあるなど、ストレス反応の有無を左右する未知の因子がありこの原因を究明し、そのこれが健康リスクとの関連を明らかにすることが重要である。

遺伝的不安定性については、丹羽はマウスのミニサテライト Ms6m を対象にして放射線によつて生殖細胞に遺伝的不安定性が生じることを示した。特に注目されるのは雄の精子に照射した場合に雌の遺伝子にも不安定性が見られるという点である。また伴らはヒトリンパ球細胞のミトコンドリア機能測定法を開発した。これによって老化におけるミトコンドリアのゲノムの不安定性を追求しようとしている。小野はヒトリンパ球の micronuclei にセントロメア染色法を導入することにより、老化による micronuclei の増加と放射線によるそれとをある程度区別出来ることを示した。これを追求することによつて細胞分裂機構の不安定性と老化、がん化との関係が追求出来ることを示した。

ヒトの細胞は試験管内ではがん化させることが極めて困難で、それはヒト細胞が特別なウイルス感染など以外には容易に不死化しないためと考えられている。これに対して鈴木らは不死化とテロメラーゼ活性との関係を調べている。その結果ヒト細胞に比べマウス、ラット細胞ではテロメラーゼ活性が高く、ヒト細胞では継代培養によってそれを失っていくが、それにも個人差があり、何らかの意味で発がんに関係している可能性がある。又、遺伝的不安定性の原因の一つとしてテロメア構造の不安定性が考えられる。

菅原はこれらを総括するとともに、世界の文献調査及び海外での意見交換などを通じて従来のモデルに対して矛盾する知見を整理するとともに放射線を主とする発ガン機構について次のような特色をまとめた。

- (1) 発ガン因子による細胞内のターゲットは DNA のような微小なもののみでなく、条件によつては細胞全体さらには幾つかの細胞からなる集団である可能性がある。
- (2) 発ガンの潜伏期からみて化学発ガンと放射線発ガンは一般には異なり、後者の方が自然のがんに近い。これから考えると基本的には 2 つの異なつた発ガン機構がありうる。
- (3) がん化の過程では遺伝子の変化即ち突然変異のほかにその発現調節の変化 (epigenetic change) が見られる。ことにプロモーション、プログレッションの過程で大きく働いていると考えられるものがある。
- (4) 慢性リンパ性白血病、子宮頸癌のように放射線による誘発はないと考えられているものについては、その原因を追求すべきである。子宮頸癌はヒトパピローマウイルスがその基礎にあることは今では良く知られているが、その上にたばこの発ガン因子が働いてがんになることを示唆する疫学的や実験的研究はあるが、放射線の場合はどうなのかが。何故発ガンに至らないか。

10. 考察

これらの結果は、従来のモデルの矛盾点を克服すると共に最初に概念図で示した我々のモデルを強く支持するものと言える。言い方をかえれば、この研究の成果として我々のモデルを支持する多くのデータがえられたと言える。しかし、このモデル自身になお二つの大きな問題が残されていることを告白しなければならない。その第一は、加納らが示した iNOS の誘発の例ではその原因が p53 遺伝子にあると考えられるが、一般にはストレス反応を生じる細胞側の条件が良くわかつていないことである。この事は多くの適応応答でも見られ、細胞の種類と条件によつて反応の大きさのみならず、その方向も反対になることがある。例えば、佐々木正夫によればマウス m5S 細胞では放射線による適応応答において後の大線量による突然変異の誘発は抑制されるが、トランスフォーメーションはかえつて昂進される。ところが、Azzam らによるマウス C3H10T1/2 細胞での実験ではトランスフォーメーションも抑制される。これらの微妙な生物反応の相違は、解析不足というよりはむしろ生物の持つ複雑性によると考えた方がよいのかも知れない。その意味でこの一連の発ガン過程を linear なものと考えず、non linear で途中の段階に negative and/or positive feed back を含むものと考えたい。これには今後実験的研究と平行して、Computer simulation を行うことを提案したい。第二はがん化と老化との関わり合いである。特に発ガン機構の特色の 2 にあげた自然発ガンと老化との関係、さらにそれと外的発ガン因子との関係は発ガンリスク推定にとつて極めて重要な問題である。残念ながらこの問題はデータも殆ど集められておらず、全く解けていない。多くの発ガン実験でもまた疫学的調査でも年齢との関係を検討したものは殆ど見られないのは残念である。

なお、予知予防の手法を具体的に示すことは出来なかつたが、発ガンについて従来の DNA の変化以外に種々のストレス反応が活用出来ることが十分に考えられる。その具体化は今後待ちたい。

11. 今後の展開

一年に満たない短期間であつたにもかかわらず、かかげた大胆な仮説にもとづく新しいモデルに対してそれを支持する幾つかのデータが得られたものと考えている。ことにプロジェクトとして目標をしぼつたことの意義はおおきかつたといえよう。しかし、これは正に feasibility study とも言うべきもので、上記の考察をふまえて新たなチャレンジングなプロジェクトに発展することができれば幸いである。先づ新しい低線量放射線生物学の確立を具体的プロジェクトとして計画している。

12. 参考文献：各分担研究にゆずる

13. 成果

論文

- (1) T.Sugahara : Hiroshima and Nagasaki : From Fear through Science to Risk Assessment. 100 Years of X-ray and Radioactivity (RON-BEC 100) D.D. Sood et

al. edited. Bhabha Atomic Research Centre, Mumbai, India, 1996 pp. 367–376.

- (2) T. Sugahara: The radiation paradigm regarding health risk from exposures to low dose radiation. High Levels of Natural Radiation - Radiation Dose and Health Effects. Elsevier, Amsterdam–Lausanne–New York–Oxford–Shannon–Tokyo, 1997 pp.331–339.

口頭発表

- (1) T. Sugahara: Action of Radiation on Living Beings: From Physicists view to Biologists view. Seminar at Institute of Radiation Medicine, Tianjin, China. May 31, 1996.
- (2) T. Sugahara: Current Status of Research on Radiation–carcinogenesis at Low Doses in Japan. BELLE Conference: Toxicological Defence Mechanisms and the Shape of Dose–Response Relationships Nov. 12–14, 1996 Research Triangle Park, NC, USA.
- (3) T. Sugahara: Alternative model to the current DNA–Damage –Mutation model in Radiation Carcinogenesis. American Nuclear Society, Winter International Meeting Nov. 11, 1996. Washington D. C., USA.

1. 分担課題名：環境因子による発がん機構のモデル化
2. 研究機関：(財)体質研究会
3. 分担者：菅原 努
4. 共同研究者：渡邊正己、丹羽太貴
5. 要約

発がん機構の新しいモデルとして環境因子に対する細胞のストレス応答に始まり発がんに至る系を念頭において現在までの知見を収集した。具体的には以下の如き 5 つのテーマ別に発がん機構の特性を検討した。

1. 放射線生物における non-quantal 性
2. 放射線誘発固形腫瘍の特性：化学発がんとの比較
3. がん化及びその悪性化の細胞生物学的指標
4. 子宮頸癌と放射線：HPV とがん化
5. 環境因子(放射線)に対する細胞反応の可変性

これに基づいてモデルの構築を試みた。しかし生物反応の可変性を主とする複雑性を考えると単純な一連の反応からなるモデルは適当ではなく確立過程とフィードバックを含む複雑系を考える必要があると結論された。これにはコンピューター・シミュレーションなどを活用する必要があると今後の課題とせざるを得なかった。

Modeling of carcinogenic process induced by environmental carcinogenes

Health Research Foundation, Pasteur Bldg. 5F, 103-5 Tanaka-Monzen-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, JAPAN

Tsutomu Sugahara

Abstract

Recent biological reports on cellular response and carcinogenic mechanisms have been widely reviewed. The following five items have been discussed to analyze the carcinogenic mechanisms induced by environmental carcinogenes especially ionizing radiations:

- 1) Biological targets at low dose radiations: Their non-quantal nature.
- 2) Gate-opening hypothesis of radiation induced solid tumors.
- 3) Detection of environmental risk factors by non-mutational events.
- 4) Cervical cancer and radiation: human papilloma virus in carcinogenesis.

- 5) High variability in cellular response to environmental factors especially to low dose ionizing radiations.

A carcinogenic model, stress response-genetic instability-multistep complicated process-cancer, was established. But in view of the variability and complexity of biological responses such a simple linear model seemed to be inappropriate. More appropriate model would be a complex stochastic system with feedback which will be established by the help of computer simulation. This would be the next step to be studied in the future project.

6. 研究の背景

発がんの過程については、従来は放射線、発がん物質にかかわらず DNA 損傷とその修復—突然変異—がんというモデルが考えられていた。これに対して低線量放射線影響の研究に端を発し、放射線などの外的因子が、先づ細胞にストレスとして働き、細胞はこれを受けてストレス反応を起こすことが示されて来た。また上記の従来モデルには最近の生物学的知見から見て多くの矛盾点があることが指摘されている。そこで新しい発がんモデルが期待されている。

7. 研究の目的

このような状況のもとで、ストレス反応が癌化、老化の引き金になるという仮説をたて、その可能性を検討する。出来ればそれに対応する新しいモデルを提案する。

8. 材料と方法

最近の情報検索システムの活用、国内外の研究者との交流を通して、発がん過程の特性を明らかにし、それにもとづく問題提起、モデルの提案を行い、研究者間の討議を経てまとめて行く。

9. 結果

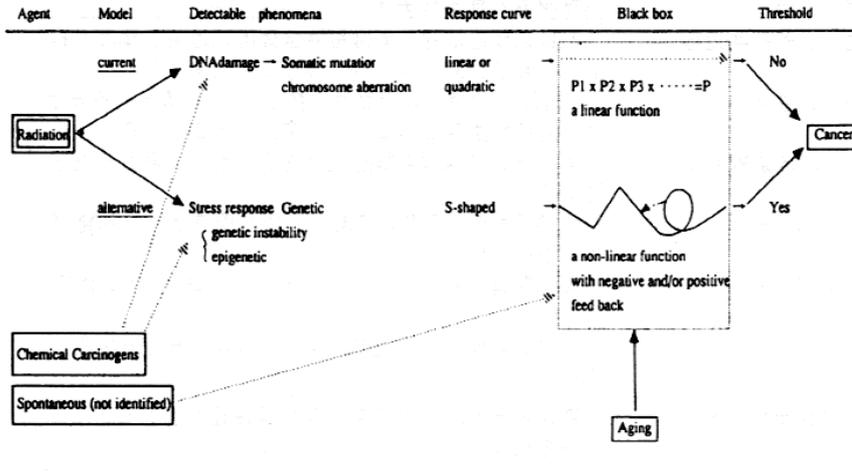
添付資料 1~5 に個別検討内容を示す。参考文献も夫々の項に示した。

10. 考察

従来モデルと対比して、提案する新しいモデルを図 1 に示した。しかし、資料 5 にある生物反応の大きな可変性を考えると、より複雑系としての理解が必要である。従って先づなすべきことは放射線生物学の見直しにあると言える。その細かい検討は別に論じたがその結果は表 1 (従来放射線生物学)、表 2 (新しい低線量放射線生物学) のようにまとめることが出来る。

菅原努：おはなし 放射線生物学その一：謎とき生物学は生物にどこまで迫れるか。環境と健康 Vol.9 No. :151 - 177 , 1996

図1



T. S. Oct. '96

表1

項目	現在の放射線生物学
生物学的初期過程	微小な標的(DNA)とそのヒット
細胞の生死	コロニー形式(増殖細胞死)
突然変異の誘発	性細胞にも体細胞にも同じ様に起こる その誘発率は10 ⁻⁵ /Gyのオーダーである
細胞の放射線感受性	最初に生じるDNA損傷は同じであるが、 修復能の差で感受性が決まる
発がんのモデル	放射線感受性の高いものは易発がん性である 代表例:色素性乾皮症(XP)、血管拡張性小脳失調症(AT)
疫学データ	原爆生存者で直線モデルが当てはまる
放射線発がんモデル	DNA損傷—突然変異—がん (しきい値なしの直線仮説)

1996年12月 菅原

表2

項目	低線量放射線生物学(新しいパラダイム)
生物学的初期過程	ストレス反応に対しては細胞全体的には細胞集団が標的になるこの時にはしきい値があると考えられる
細胞の生死	0.5Gy以下で特に高感受性、数Gy以上で遺伝的不安定性が見られ生存コロニーは非常にヘテロである
細胞の放射線感受性	アポトーシスは放射線感受性を高めるが、発がんを予防する
発がんのモデル	XP、ATはむしろ例外であり、放射線感受性と易発がん性は平行しない
疫学データ	原爆生存者でも0.2Gy~0.5Gy以下では増加は有意ではない 高自然放射線地域住民では染色体異常と発がん率とが平行しない
放射線発がんモデル	多重フィードバックを含む非直線性確率論的モデルが期待される

1996年12月 菅原

放射線生物学における non-quantal 性

菅原 努

一般に受け入れられている放射線の細胞に対する作用の説明はターゲット説を骨子とするものである。これを私は放射線の quantal 性と呼ぶことにする。これに対して最近放射線の作用は細胞に確率的にあらわれるのではなく、全ての細胞に線量に応じた程度にあらわれると考えた方が良いと思われる現象がいくつが示されるようになった。これに対して二つの考え方が可能である。すなわち、

(1) 放射線は活性ラジカルを作り細胞全体をターゲットとして何かの変化をおこす。即ちターゲットが大変大きいので確率的ではあるが見掛け上すべての細胞に変化が起こったように見える。これには佐々木正夫の言う如く細胞間連絡でターゲットが更に大きくなる場合も含まれよう。

(2) 放射線が細胞に何か液性の因子をださせる。この因子は周囲にあるすべての細胞に一定の変化をおこす、と言うものである。以下に non-quantal の例を示す。

Adaptive response : この現象は起こるとすれば数 cGy の前照射を受けたすべての細胞にみられる。ことに Joiner et al. の細胞生存率の実験を見れば明らかである。

Clastogen induced by radiation (Emerit et al) : 彼等は血清のみを照射してもできないが、全血を照射するとリンパ球に染色体異常を起こさず因子ができると言っている。この働きは antioxidants で押さえることができる。

Soluble mediators of inflammation involved in radiation reactions (A. S. Michalowski) : 下の表に示すように放射線によって色々のサイトカインその他が放出されることが知られている。これを彼は humoral effects of irradiation と言い、直接のランダムな殺細胞効果と根本的に異なる事を強調している。

Cellular basis of radiation-induced fibrosis (Rodemann) : 放射線の正常組織に対する晩発効果は今まではターゲット細胞の放射線による死とその細胞動態の乱れによって説明されてきた。これに対して多細胞系のサイトカイン等による相互作用とその放射線による産生による乱れによるものと考えている。

Heat shock response (Freeman) : 放射線は Oxidative stress としては弱い heat shock response を起こす。それは蛋白 SH の酸化によると考えられるが、放射線の場合は酵素活性などを落とすが、蛋白変性を起こす程強くないからである。

今のところ、これらの考え方は clastogenic factors 以外は発ガンとの関係について直接ふられていない。fibrosis と悪性腫瘍との比較は極めて興味のある問題である。サイトカインなどの因子が照射後どのくらいの期間産生されるのが、これらによる増殖刺激は突然変異を誘発しないのが、老化とこれらの液性因子との関係は、など多くの興味のある問題がある。遺伝的不安定性と液性因子との関係も気になるところである。

発ガンにおいては、今の考え方は quantal 的であると私は考えているので、そこに non quantal 的なものがあるかどうかは極めて大きな問題である。non quantal であれば当然 threshold の存在が考えられる。

文献

- (1) I. Emerit et al: Radiation-induced clastogenic factors: Anticlastogenic effect of Ginko biloba extract. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(6) 985-991, 1995
- (2) I. Emerit et al: Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: Anticlastogenic effect of Ginkobiloba extract. *Raiat. Res.*, 144, 198-205, 1995.
- (3) A. Michalowski: The pathogenesis and conservatine management of radiation injuries Minireview. *Neoplasma* 42(6), 289-292, 1995.
- (4) A. Micholowski: Anti-inflammatory drug treatment of radiation injuries. 10th ICRR 1995.
- (5) H. P. Rodemann and M. Bamberg: Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiotherapy and Oncology*, 35, 83-90, 1995.
- (6) B. Marples and M. C. Joiner: Response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: Evidence of enhanced sensitivity of the whole cell popuation. *Radiat. Res.*, 133, 41-51, 1993.
- (7) B. Maples and M. C. Joiner: The elimination of low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79-379A cells by pretreatment with X-rays or hydrofen peroxide. *Radiat. Res.*, 141, 160-169, 1995.
- (8) M. Akiyama et al: Mutation frequency in human blood cells increased with age. *Mutation Res.*, 338, 141-149, 1995.
- (9) M. Freeman: Oxidative stress. The stress response- A radiation section study workshop, Santa Fe, New Mexico, Feb. 25, 1995. *Radiat. Res.*, 145, 107-117, 1995.

Gate opening hypothesis of radiation-induced solid tumors

T. Sugahara

この題は仮のものです。その意味は放射線はプロモーターの様に働くが変化の rate を変えるのではなく、変化の量をかえるので丁度門を開けるような働きをするということであらわしたい訳です。

今度 French Academy of Science が ICRP を批判する報告が出され、これに対して NRPB が反論する報告を公表しています。これを要約すると次のようになります。

France : low dose では repair が十分に働くからがんのリスクはない。即ち error free repair である。

NRPB : low LET radiation でも double strand break が起こるので、これは error prone で突然変異をへて、がんというメカニズムをとっている。これに対して低線量の放射線では oxidative stress として働くほうが大きく、non genotoxic なメカニズムが考えられる。しかし、これらのいずれが本当かを分子レベルの解析で決めることは出来ないであろう。というのは、いずれの変化も観察されてどれが主役であるかの決め手に欠くと思われるからである。

そこで A bomb survivors の場合にみられる自然発がんとの関係を変異原性の明らかな発がん物質と比較することを提案する。即ち、図 1 にモデル的に示したように潜伏期または年齢と発がんの関係は、A、B、C の 3 つの場合が考えられる。A は放射線の場合で、B は発がん物質、C は放射線を若年被爆した場合と仮定した。この仮定が何処まで成立するかを、疫学および動物実験のデータで調べようということである。

疫学の分野では潜伏期についての記載は極めてすくない。その理由は Don & Peto : The Causes of Cancer , 1981 の次の文章にあるのではなからうか。“私どもは、主要な分析にはいずれも、“潜伏期”、“短縮された潜伏期”、“発ガン時平均年齢”とか、これに似た指標で表わさないように心がけてきた。その理由は、このような考え方やこれを生んだ統計的方法は大きな誤解を生むような結論をしばしば導いているからである。”この点について疫学者の意見を是非ききたいものである。

手じかにある国際的な報告書にはこれに役立つ記載が若干あった。

NCRP Report No. 96, 1986 では次のようにまとめている。The latency for solid cancers is characteristically longer than that for leukemias, and the age-distribution of the induced cancers tends to resemble that of “naturally” occurring cancers of corresponding types. — Whether the same age relationship holds for the effects of carcinogenic chemicals cannot be determined without further data.

ここには化学発ガン物質の場合に潜伏期が短縮している二つの例が示されている。もう一つの例は UNSCEAR 1993 Report の Annex E : Mechanisms of Radiation Oncogenesis

の IV Comparative Aspects of Oncogenesis by Radiation and Chemicals である。その書き出しは次ぎのようになっている。It has been suggested that ionizing radiation may principally, but not exclusive, initiate oncogenesis through mechanisms involving DNA deletion and/or rearrangement. While many chemical agents also induce gross (chromosomal) damage in mammalian cells, the mechanisms of induction are fundamentally different from those of radiation. —— The majority of chemical agents act principally as point mutagens.

しかし、残念ながらその違いをどのようにして明らかにするかについては何もふれていない。

これから図 1 に相当するデータを集めてこのモデルの成否を確認したいが、ご承知のようになかなか集まらないのが実情である。

放射線の場合に図 1 の A の様になるとすればそのメカニズムをどのように考えるのか。そこで考えたのが標題の仮説である。正常細胞から年齢とともにガン細胞に向かう変化の流れがあると考え。この流れには幾つかの関所があって極めて僅かの細胞しか通れない。放射線はこの関所の門を少し開ける働きをすると考える。この考え方をいれたモデルを図 2 に示しました。例えば Trosko のいう放射線による oxidative stress が gap-junction の down regulation を起こすとすれば、一回照射では 1Gy 位のところに threshold があることになるであろう。低線量の連続照射でそれがどのくらいになるかはこれからの課題である。

環境障害要因の non mutational な現象による検出の可能性

菅原 努

1. 本新技術団研究計画の概念図にも示した如く、non mutational な現象をがんと結びつけることは、われわれの目的の一つである。その点の可能性について渡辺らのデータのほか文献上よりのデータを合わせて検討した。

2. データ :

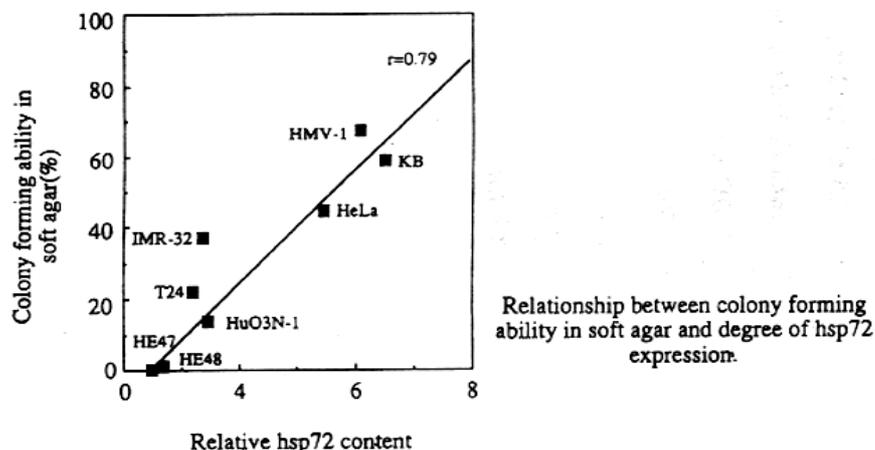
p.19、20 は何れも渡辺らのグループのもので p.19 は constitutive hsp72 の量が、p.20 fibronectin の量が正常からがんに到る間に悪性度と共に変化することを示している。p.21 は Y. Kamibayashi et al.: Aberrant expression of gap junction proteins (connetins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo. Carcinogenesis, 16 (6) 1287 - 1297 , 1995 . によるもので gap junction proteins の down regulation ががんの進行と共に進むことを示している。彼等はこれを epigenetic な変化と見ている。P.22 は Trosko らのグループのもので gap junction の post-translational level での変化を指標にして発がん要因 (彼等は tumor-promoting としている) を検出する可能性を示している。

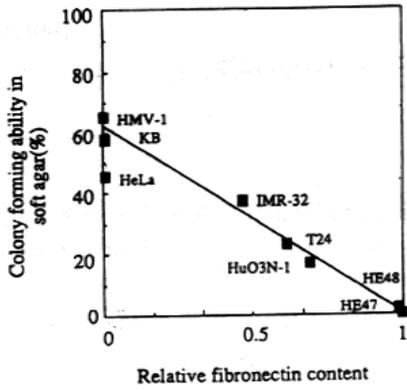
3. 考察 :

以上の私の理解が正しければ、私たちのねらいは Trosko に先をこされた感がある。もっと別の例えば non-disjunction や aneuploidy をうまく検出する系が同じように作れないであろうか。

班員各位の批判と提案を期待する。

内部資料3





Relationship between colony forming ability in soft agar and degree of fibronectin expression. The relative amount was expressed as the ratio of the amount of fibronectin to that of HE47.

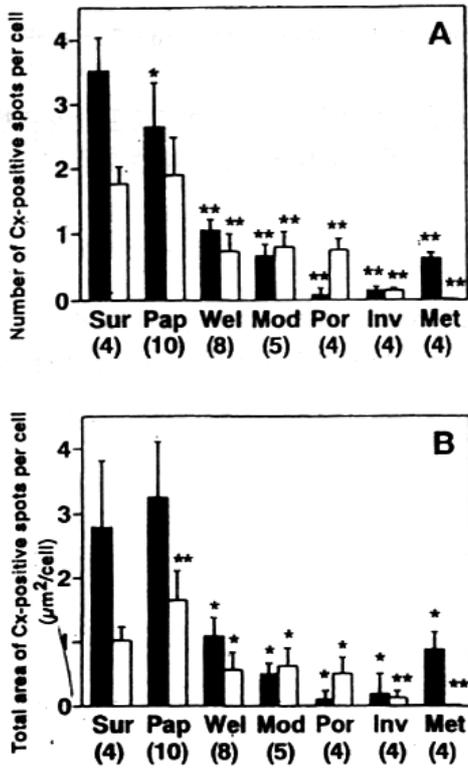


Fig. 7. Morphometrical analysis of Cx26- and Cx43-positive spots during multistage mouse skin carcinogenesis. (A) The number of Cx26- and Cx43-positive spots per cell. (B) The total area of Cx26- and Cx43-positive spots per cell. Gray bars, Cx26; white bars, Cx43. Sur, surrounding non-tumorous epidermis; Pap, papillomas; Wel, well-differentiated SCCs; Mod, moderately differentiated SCCs; Por, poorly differentiated SCCs; Inv, SCCs at invasive sites; Met, SCCs metastasized into lymph nodes. Individual columns are the mean \pm SD. The figures in parentheses represent the number of samples examined. Statistical analysis was by Student's *t*-test or Welch's *F*-test: **P* < 0.05; ***P* < 0.01 versus surrounding non-tumorous epidermis.

Y. Kamibayashi et al. 1995

子宮頸癌と放射線

菅原 努

1. はじめに

ICRP など現在のパラダイムは放射線による DNA damage Mutation をがんへの出発点とし、低線量でも DNA double strand break がたとえ確率が低くても起こるので、どんな微量でもリスクがあるとしている。この DNA の変化はどの組織、細胞でも起こる筈であるのに放射線に対して発癌感受性のない部位があると考えているのは何故か。また白血病でも CLL は放射線によらないとするのは疫学データでは論理的にネガティブを証明できない筈なのに何時もそれを除外して統計しているのは矛盾しているではないか。

以上の様な疑問を背景に human papilloma virus (HPV) の関与が濃厚な子宮頸癌と放射線の関係を検討する。

2. 子宮頸癌と HPV

子宮頸癌の主要なリスクファクターが HPV であることは広く認められている。HPV には 70 以上の型があり、その中 23 が頸癌に見出され、さらに 6, 11 型のように low risk のものも、16, 18, 31, 45 型のように high risk のものもある。しかし、HPV 感染者のうちで本当に頸癌に発展するものはその一部であって、何らかの他の因子の関与が必要と考えられている。^{1), 2)}

3. 子宮頸癌とたばこ

この HPV 以外の因子としてたばこが考えられる¹⁾。文献上は疫学ではこの点で賛否両論がある。

- A) 喫煙をリスク因子として認め、または支持する疫学的研究^{1), 3), 5), 6)} 及びたばこ由来の発がん物質の存在を証明した実験疫学的研究^{1), 2)}
- B) 実験的研究で喫煙の役割を証明したもの^{4), 8)}
- C) 喫煙との関係について否定的なもの⁷⁾

以上のように現在までのデータは未だ決定的ではないが、たばこの中の発がん物質の関与の可能性は極めて高い。

4. 子宮頸癌と放射線

種々の部位のがんとの関係は原爆生存者についての RERF の研究が標準的なものと考えられている。

死亡率については新線量 DS86 による第 11 報 (1988)⁹⁾でも、最近の第 12 報 (1996)¹⁰⁾でも放射線による増加は認められていない。ただ問題は子宮頸癌と子宮体癌とが統計上分別されていないことであるが、わが国では後者は少ないとして主として前者をあらわすものとしている。また罹患率についても結論として「子宮がんにはどれも放射線被曝との関連はないようであった」とされている。¹¹⁾

5. 問題提起

子宮頸癌が HPV によるとして、その他に発がん物質としてのたばこが考えたとしたら、何故同じ発がん因子である放射線は関与しないのか。この点は実験的研究でもっとつめる必要がある。

その上で著しくこれが事実であるならばどのようなメカニズムが考えられるか。従来のパラダイムによるとすれば放射線に極めて弱い発がん因子ということになる。我々の言うストレス反応から出発するとすれば HPV によって不死化した細胞ではこのようなストレス反応が生じないのか。それを一般の放射線発がんモデルとどのように組み合わせるのか。今のところ全体を説明しうるモデルは未だ考えられていない。問題提起を兼ねて一つのモデルを提案する。

発がんのプロセスとして細胞としての不死化と悪性化の 2 つがあり、放射線はその何れの段階に働くのかということから考えて見たい。

Watanabe ら¹³⁾は低線量線の反復照射でヒト正常細胞の寿命延長と transformation 様変化を認めたと、不死化に到らず悪性化はしなかった。反復照射でヒト細胞の不死化を得、その後悪性化した例は難波ら¹⁴⁾最近では Kuettel ら¹⁵⁾のものがあるが線量も大きく極めてまれである。これらの結果から通常の放射線発がんにおいて不死化と悪性化のどちらが先かを結論することは出来ない。

最近、石井と渡辺¹⁶⁾はヒト胎児 (HE) 細胞と HeLa 細胞で 10 - 20cGy の照射による適応々答を比較し、前者で見られる現象が後者で見られないと報告している。また前者も Ca⁺イオンの排除や TPA 処理で細胞間コミュニケーションを阻止すると適応々答が見られなくなる。また前に難波の作った不死化細胞では既にコンフルーエント時の温熱感受性が高く、細胞間コミュニケーションが阻害されていることを見ている。¹⁷⁾不死化した細胞は多分適応々答を示さないであろう。すると HPV で予め不死化した細胞は低線量の放射線で適応々答を含むストレス応答を示さずがん化に到らないと考えられる。突然変異を強く起こす化学発がん剤や大線量放射線で不死化した細胞も初めて悪性化すると考えてはどうであろうか。

最近不死化したヒト細胞によるがん化の研究が進んでおり、それによる放射線発がんの実験もいくつか報告されている。¹⁸⁾これらと上記の提案との関係については更に詳しく検討する必要がある。

文献

- 1) P. Braly: Preventing cervical cancer. Nature Medicine 2(7), 749-751, 1996.
- 2) 塚本直樹：至急頸癌の治療方法。日放腫会誌 8: 85-95, 1996.

- 3) A. Szarewski et al.: Effect of smoking cessation on cervical lesion size. *Lancet*, 347(9006), 941-943, 1996.
- 4) Y. Nakao et al.: Malignant transformation of human ectocervical cells immortalized by HPV-18. in vitro model of carcinogenesis by cigarette smoke. *Carcinogenesis*, 17(3) 577-583, 1996.
- 5) S. K. Kjaer et al.: Human papillomavirus--The most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Inter. J. Cancer*, 65(5) 601-606, 1995.
- 6) M. Frisch and M. Melbye: Risk of lung cancer in pre- and postmenopausal women with ano-genital malignancies. *Int. J. Cancer*, 62(5), 508-511, 1995.
- 7) K. M. Stone et al.: Sexual behavior, sexually transmitted disease, and risk of cervical cancer. *Epidemiology*, 6(4), 409-414, 1995.
- 8) Sigemore, H. et al.: Differential response of normal and HPV immortalized ectocervical epithelial cells to B(a)P. *Carcinogenesis*, 16(10), 2413-2418, 1995.
- 9) Y. Shimizu, H. Kato, W. J. Scull: Life span study report 11. Part 2. Cancer mortality in the year 1950-1985 based on the recent revised doses (DS86). RERF TR-5-88, 1988.
- 10) D. A. Pierce, Y. Shimizu, D. L. Preston, M. Yaeth, and K. Mabuchi: Studies of the mortality of atomic bomb survivors. Report 12, Part 1. *Cancer: 1950-1990. Radiat. Res.*, 146, 1-27, 1996.
- 11) D. E. Thompson, 馬淵清彦ほか: Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II. Solid tumors 1958-1987. *Radiat. Res.*, 137, S17-S67, 1994 (RERF TR5-92, 1995).
- 12) Prokopczek, B. et al.: Identification of tobacco-specific carcinogens in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 37, Abstr. 100 (1996).
- 13) Watanabe M. et al.: Effect of multiple irradiation with low doses of gamma-rays on morphological transformation and growth ability of human embryo cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 711-718, 1992.
- 14) Mamba, M. et al.: Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with ⁶⁰Co gamma rays. *Int. J. Cancer*, 35, 275-280, 1985.
- 15) Kuettel, M. R. et al.: Radiation-induced neoplastic transformation of human prostate epithelial cells. *Cancer Res.*, 56, 5-10, 1996.
- 16) 石井敬一郎、渡辺正己：ヒト胎児細胞における放射線適応々答と細胞情報伝達の関係 組織培養研究 15 (2) 123 - 129 , 1996 .
- 17) 渡辺正己：未発表
- 18) 難波、渡辺、Hayflick 編著：ヒト細胞の老化・不死化の癌化 共立出版 1996 .

放射線に対する生物反応の可変性

菅原 努

1. はじめに

低線量放射線による新しい発がんモデルを構築するべく、分担研究者のデータ及び文献調査によって集めたデータを比較検討した結果、放射線（比較的 low dose）に対する細胞レベルでの生物反応に大きなばらつきがあることに気付いた。細胞の種類、照射時の条件によって反応の大きさのみならず、場合によっては方向（促進と抑制というような）さえも異なることを見出した。以下にいくつかの例をあげる。

2. 可変性の例 1) 細胞の age response と突然変異細胞周期による生存率と突然変異率の比較が Watanabe によって Hela 細胞（図 2）1) と GHE 細胞（図 1）2) とで調べられている。前者では生存率と突然変異率とは鏡像の関係にあり、後者ではほぼ平行している。

図1

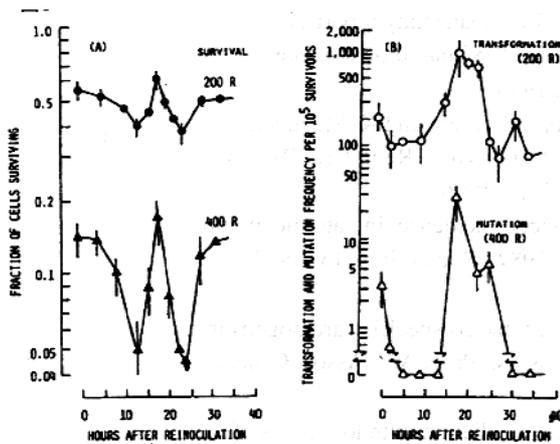
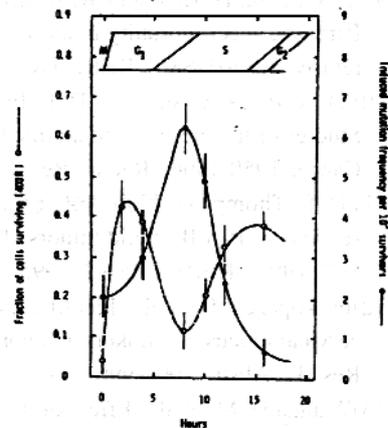


図2



- 1) M. Watanabe & M. Horikawa: Mutation Res. 71:219-231, 1980
- 2) M. Watanabe, H. Suzuki, S. Sawada & O. Nikaido: Carcinogenesis 5:1293-1299, 1984

2) 適応々答の有無

正常細胞では適応々答が見られるが悪性細胞では見られない。

M. S. Sasaki : Int. J. Radiat. Bio. 68 : 281 - 291 , 1995 .

マウス m5S 細胞で 2cGy で見られるが、これの悪性化した 6110 細胞では見られない。

K. Ishii & M. Watanabe : Int. J. Radiat. Bio. 69 : 291 - 299 , 1996 .

hum normal fibroblasts HE19, HE22, HE57 で 10 - 20cGy によって見られたのに、Hela cells では見られない。前者でも TPA、Ca 除去によって細胞間連絡を絶つと見られなくなる。

分担課題報告書(2) 小野公二

Micronucleus Assay による DNA 損傷の蓄積量の検索と高発ガン个体群の検出の可能性に関する研究

Evaluation of Accumulated DNA Damage by Micronucleus Assay and Detection of High Risk Group of Cancers

研究者 小野公二(京都大学原子炉実験所・教授)

研究協力者 木梨友子(京都大学原子炉実験所・助手)

抄録

spontaneous micronucleus と放射線照射によって誘導される micronucleus を鑑別するため C 染色を行い、micronucleus 頻度と線量の関係調べた。用いた実験腫瘍細胞では未照射細胞 1000 ケにつき 8.2-17.5 個の micronucleus が出現する。このうち 70 - 85% の micronucleus は C 染色陽性の centromere を有する micronucleus であった。micronucleus の頻度は照射線量と共に増加したが、C 染色陽性の micronucleus は 6Gy で総数の 8.5%、10Gy で 9.7% であった。

目的

遺伝物質 DNA に蓄積された損傷の総体の多寡を micronucleus の発現頻度を指標として調べヒト个体の発ガンとの関連を検索する。さらに、micronucleus の発現頻度が、非発ガン个体群から将来発ガンする可能性を有する高危険个体群を検出する指標となり得るかどうかを検索する。

方法

micronucleus には centromere を有するものとこれを持たないものがある。そこで、実験腫瘍(マウス扁平上皮癌細胞 CCVII)を用いて、線量・micronucleus 頻度・centromere の有無を検討した。ペトリ皿で対数増殖している SCCVII 腫瘍細胞にガンマ線(0Gy - 30Gy)を照射し、一部をコロニー形成率測定法による細胞生存率測定に使い、一部を micronucleus assay に供した。micronucleus assay では細胞質の分裂は阻害するが、細胞核の分裂は阻害しない物質 cytochalasin B (2ug/ml) を加え十分数の細胞が分裂期を通過し、2核になるまで培養を継続した。細胞をトリプシンで剥離後、カルノア氏液で固定、スライドガラス上に伸展固定し、ギムザ染色を施した。同時に C 染色を行い、発現した micronucleus が centromere の有無を調べた。

結果と考察

図 1 に示すように SCCVII 腫瘍細胞は片対数グラフ上、5Gy 以下の線量域に肩を持ち、高

線量域では直線となる様な線量・生存率曲線を示す。線量と micronucleus 頻度の関係は図 2 に示す。線量の増加に伴う micronucleus 頻度の上昇は一定ではなく、低線量域では緩やかであるが線量が高くなるに従って急激に上昇する。これは図 1 の線量と細胞生存率の関係とよく符合している。未照射の細胞で認められる micronucleus は約 80%が centromere を有するものであるのに対し、放射線によって誘発される micronucleus は centromere を持たないものが殆どである。C 染色によって放射線照射に固有の micronucleus を検索することが出来ることが明らかになった。この手法を用いて今後以下の研究を更に進めていく予定である。

(1) ヒトより採取した血液から比重勾配遠沈法によってリンパ球を分離し、培養系に移す。分裂刺激を与えた後、サイトカラシン B を加え更に培養を継続する。2 核細胞集団の一部に micronucleus を有するものがあり、2 核細胞の総数に対する micronucleus 総数から頻度を求める。さらに、micronucleus には centromere を持たない染色体断片に由来するものと、そうでないものがある。これらを C 染色で識別し両者の発現頻度を区別して評価する。
 (2) 分離したリンパ球の一部には ~2Gy の放射線を照射し、誘発される micronucleus の頻度についても検索する。
 (3) 対象とする若年から老年までのヒト個体を非発ガン個体、発ガン個体でガンの家族歴を認めないもの、発ガン個体で濃厚なガン家族歴を認めるもの、の 3 群に分ける。従来の研究によって micronucleus の発現頻度には個体の年齢依存性が報告されているので得られる年齢データを基準にしてこれらデータを解析し、micronucleus の頻度で見た DNA 損傷の多寡および放射線に対する感受性の高低が発ガンにおよぼす影響を検索する。更に、データの総合的解析から、micronucleus assay によって非発ガン個体で将来発ガンする可能性の高い高危険群を予測する可能性を検索する。

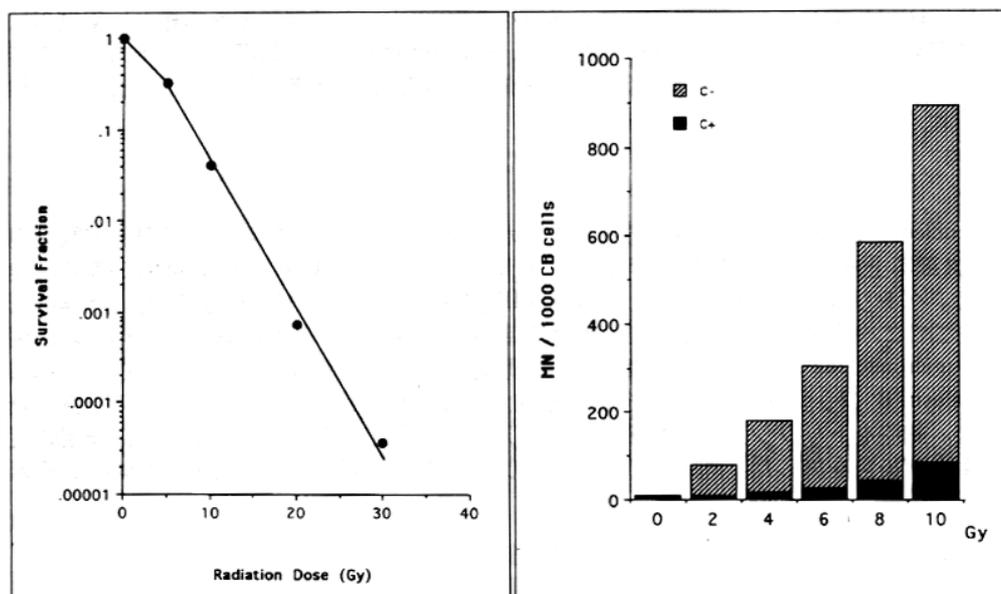


図1

図2

分担課題報告書(3) 伴 貞幸

Mitochondrial genetic instability, cell aging, and cell death
Sadayuki Ban (Dept. of Radiation Biology, RERF)

It was recently reported that mitochondrial transmembrane potential (Ψ) decreases prior to cell death and that bcl-2 protein inhibits apoptosis by maintaining Ψ . These results together with innumerable others in the literature suggest that investigating the variation of Ψ and mitochondrial function will help to elucidate the molecular mechanism of cell aging and cell death.

The purpose of this study is to establish methods to evaluate the variation of Ψ and mitochondrial enzyme in various subpopulation of human peripheral blood lymphocytes. Lymphocytes were treated with Rh123, a Ψ indicator, and labeled with various fluorescent antibodies. Using the FACScan, the intensity of green fluorescence emitted from Rh123 was measured for CD4⁺, CD8⁺, NK, CD4CD45RA⁺ cells. Ψ of CD8⁺ and NK cells tended to be higher than that of CD4⁺ cells. Ψ of each subpopulation showed very large interindividual variation. X irradiation, hyperthermia and a magnetic field modified the Ψ of some subpopulations. Mitochondrial NADH dehydrogenase activity was measured by the MTT-Rh123-Flow cytometry (MRF) method, which we developed to assess mitochondrial function. Briefly, lymphocytes are treated with MTT and Rh123. Water-soluble MTT is converted to the dark-violet, water-insoluble Formazan crystal by NADH dehydrogenase. The green fluorescence from Rh123 incorporated into mitochondria is absorbed by the Formazan crystals. The decrease of Rh123 fluorescence intensity is correlated with the amount of Formazan and thus the enzyme activity. The enzyme activity in CD8⁺ and NK cells was higher than that in CD4⁺ cells. The MRF method has been applied to lymphocyte samples obtained from patients with Werner syndrome, an autosomal recessive hereditary syndrome showing premature aging. Preliminary data show a decreased enzyme activity in CD8⁺ and NK cells of these patients.

「科技団プロジェクト 96」菅原班分担研究報告書

ミトコンドリアゲノムの不安定性とそれのヒト細胞老化への関与

放影研・放射部 伴 貞幸

[目的]

細胞老化あるいは細胞死をエネルギー代謝の観点から調べるために、末梢血リンパ球亜集団細胞のミトコンドリア機能を測定する方法を開発する。

[材料と方法]

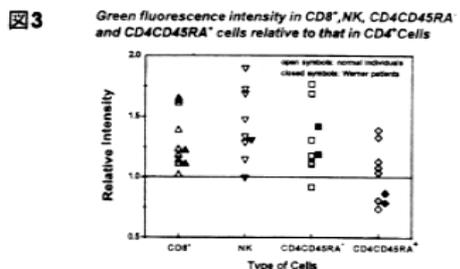
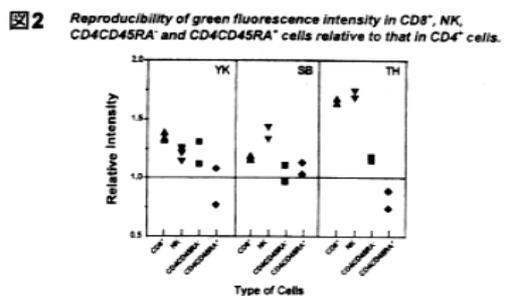
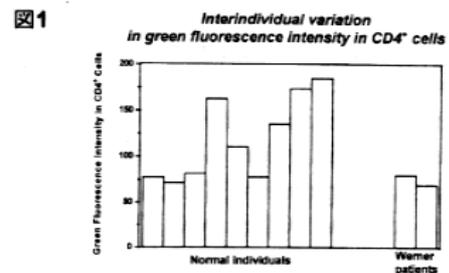
(1) ミトコンドリア膜電位 (Ψ) の測定：ローダーミン (Rh123) は生細胞のミトコンドリア内に特異的に蓄積する親脂質性陽イオン荷蛍光色素である (L. V. Johnson et al, 1980)。Rh123 の取り込みは Ψ を測定する指示薬であることはすでに良く知られている (L. V. Johnson et al, 1981; S, Danis et al 1985)。正常健康人 (30 - 50 才) および早老症遺伝病 Wemer 症候群患者より得られた末梢血細胞から、Ficoll-Hypaque 遠心法でリンパ球細胞を分離した。細胞を 2.5mMRh123 で 20 分間処理後、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD4CD45RA 抗体で標識し、各亜集団細胞における Rh123 からの蛍光強度を FACScm で測定した。

(2) NADH 脱水素酵素活性の測定：黄色水溶性化合物 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) は、ミトコンドリア NADH 脱水素酵素により暗紫色の難溶性 Formazan 結晶に変換される。リンパ球細胞に種々の濃度の MTT を処理し、次いで Rh123 をミトコンドリアに取り込ませると、Rh123 の蛍光が Formazan 結晶に吸収される。Rh123 の蛍光強度の減少度を FACScan で測定することによって、各リンパ球亜集団細胞間の酵素活性を比較することができる (MRF 法)。MRF 法は我々が開発した方法であり、まだ類似の報告はなされていない。

[結果]

ミトコンドリア膜電位 (Ψ) の測定：9 人の健康人と 2 人の Wemer 患者由来の CD4⁺細胞における Ψ を比較した結果を図 1 に示す。なお、CaliBright beads (Beckton Dickinson) の、緑色蛍光を 50 に設定して、蛍光強度の標準とした。 Ψ には大きな個人差が観察されるのだが、リンパ球細胞の分離過程において不特定の物理的刺激を受けており、図 1 の結果には技術的問題が含まれる可能性がある。そこで、各リンパ球サンプルについて、CD4⁺細胞中の蛍光強度を内部標準として、それに対する CD8⁺, NK, CD4CD45RA⁺ (memory) および CD4CD45RA⁺ (Naive)細胞中の Ψ を比較した。図 2 に、約半年間に 3 人の健康人から 2 ~ 3 回の採血を行って、各亜集団細胞内の Ψ を比較した結果を示す。各血液提供者において、比較的再現性の良い結果が得られた。

図 1 での血液提供者における、CD4⁺細胞中の Ψ に対する各亜集団細胞間の Ψ の比を図 3 に示す。健康人の間にはどの亜集団細胞においても非常に大きな個人差が見られる。CD8⁺, NK および memory 細胞中の Ψ は CD4⁺細胞中のそ



れに対して高い傾向にある。また2例しか調べていないが、Werner 患者では亜集団細胞のΨの変動は小さかった。

酵素活性の測定：従来より、ミトコンドリア機能を調べる目的で、NADH 脱水素酵素によって難溶性暗紫色の Formazan 結晶に変換される反応が利用されている。Formazan 結晶を溶解してその溶液の吸光度を測定することによって酵素活性を比較できる。しかし、リンパ球細胞中に出現する Formazan 結晶を各亜集団細胞ごとに溶解することは非常に困難である。それで、各亜集団細胞のミトコンドリア内に取り込まれた Rh123 の蛍光強度が Formazan 結晶に吸収されて減少するかどうかを調べた(図4)。リンパ球細胞に 1.2m MTT を処理

図4 (1) **Effect of MTT on the Intensity of Rh123 Fluorescence in CD4⁺ Cells**

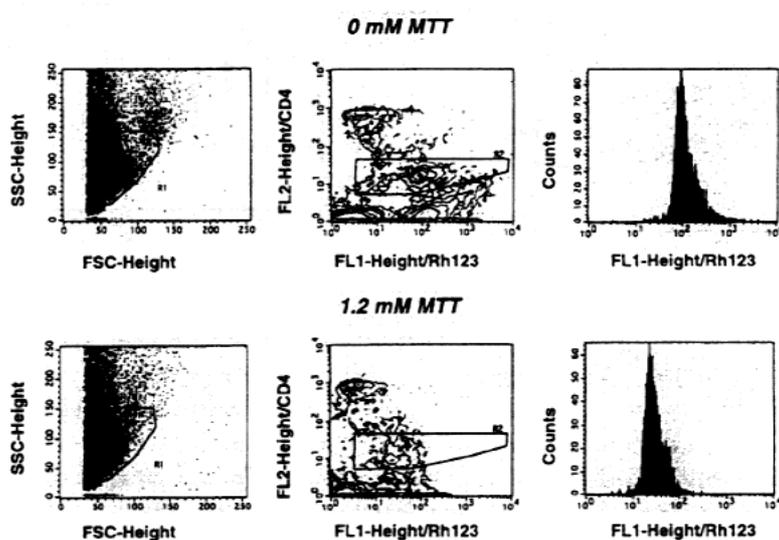
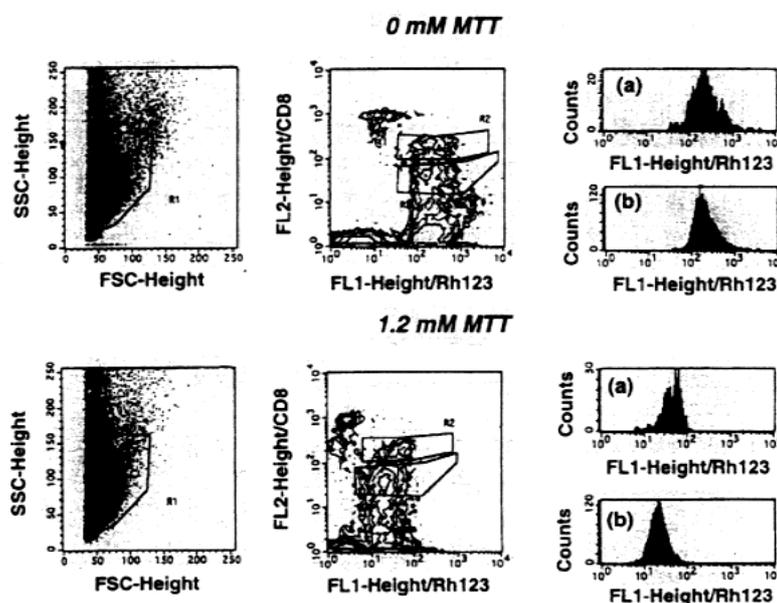


図4 (2) **Effect of MTT on the Intensity of Rh123 Fluorescence in CD8⁺ Cells (a) and NK Cells (b)**



した場合、いずれの亜集団細胞においても蛍光の減少が観察された。複数の健常人から得られた末梢血リンパ球に種々の濃度の MTT を処理した場合、MRF 法で調べた蛍光強度の変動パターンは各細胞間によって異なる (図 5)。CD4⁺細胞は低濃度の MTT 処理で特異的な変化を示した。NK 細胞における蛍光強度の減少が一番強かった。memory および naive 細胞の変動パターンはいずれも CD4⁺細胞のそれと一致していた。

図5(1)

Effect of MTT on the Intensity of Green Fluorescence in Rh123-treated CD4⁺, CD8⁺ and NK Cells. Bars indicate the mean±S.D. of seven individuals.

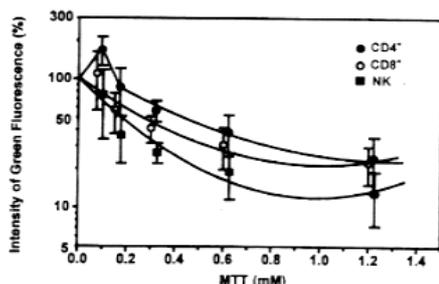
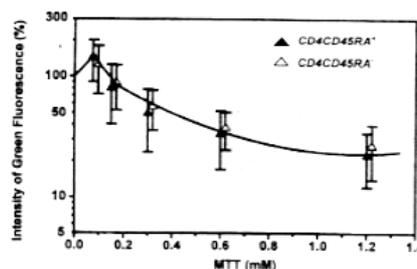


図5(2)

Effect of MTT on the Intensity of Green Fluorescence in Rh123-treated CD4CD45RA⁺ and CD4CD45RA⁻ Cells. Bars indicate the mean±S.D. of six individuals.



[考察]

ミトコンドリアの膜電位 (Ψ) はアポトーシスの非常に早い段階で重要な役割を持つことが明らかになっている (P. Marchetti et al, 1996)。C. Richter ら (1996) は、*bcl-2* が Ψ を維持することによってアポトーシスを防ぐと考えている。即ち、細胞死の機構を考える上で、 Ψ は重要な指標であると思われる。本研究では、リンパ球細胞の Ψ が、個人間および亜集団細胞間で非常に異なることを明らかにした。しかし、 Ψ の違いが各細胞の本来の機能とどのような関係があるのかはまだ全く不明である。現在、リンパ球細胞に X 線照射、温熱処理あるいは磁場曝露を行い、各亜集団細胞内の Ψ の変動を調べており、非常に興味ある結果が得られつつある。

我々の開発した MRF 法はヒト末梢血リンパ球亜集団間のミトコンドリア機能に差があることを示している。MRF 法を使って、Werner 患者由来リンパ球細胞中の酵素活性も測定している。まだ 2 例しか調べていないが、CD8⁺ および NK 細胞における酵素活性は健常人に比べて低かった。Werner 患者では CD8⁺ および NK 細胞の数自体も少なく、 Ψ も低い傾向にあり、これらは新しい知見である。更に数例の Werner 患者からの血液サンプルが得られる予定であるので、よりはっきりした結果が得られると期待している。他方、本研究の一環として、ミトコンドリアゲノムを完全に欠損している (mtDNA⁻) 細胞を HeLa 細胞から分離することに成功した。mtDNA⁻ 細胞でのミトコンドリア DNA は PCR 法で全く検出されない。まだ 1 回の検査ではあるが、蛋白量当たりの ATP 量は親株のそれに比べて約半分に減少していた。mtDNA⁻ 細胞を各種細胞と融合することにより、エネルギー代謝をコントロールするゲノムの解析も将来可能であると思われる。

分担課題報告書（４）丹羽太貴

Role of radiation induced genetic instability in germline mutation of a mouse minisatellite locus.

Ohtsura Niwa, Dept. Mol. Pathol. RIRBM, Hiroshima University

Mutation has long been thought to be induced directly by DNA damages registered by radiation. However, recent studies indicated that radiation induces delayed mutation which is expressed in the progenies of irradiated cells after many cycles of replication. Delayed mutation suggest that radiation-induced mutation through indirect mechanism.

In the present study, we have analyzed radiation induction of germline mutation at a mouse hypervariable minisatellite locus, Ms6hm. Male C3H/HeN mice were irradiate with ⁶⁰Co gamma-ray, and mated with C57BL/6N mice. DNA was extracted from the tail tissue of F1 mice and analyzed by Southern blotting using the Ms6hm locus specific probe. The Ms6hm locus exhibited a high frequency of spontaneous germline mutation of around 10%. Irradiation of male parents resulted in higher frequencies of mutation in F1 mice. The spermatide stage was most sensitive and the mutation frequency in F1 mice was elevated to 22% after irradiation with 1 Gy. This frequency was at least three orders of magnitude higher than that expressed from the number of DNA damage given to the cells and strongly suggested that the mutation at the Ms6hm locus was induced indirectly as a result of radiation induction of genetic instability in germ cells. Moreover, irradiation of male parents at the spermatozoa stage resulted in the increase in the frequency of mutation of the maternally derived allele of the Ms6hm locus in F1 mice. This again indicates that DNA damage introduced by the irradiated sperm induced genetic instability in zygote which in turn induced mutation at the locus of the female pronucleus.

新技術事業団財団プロジェクト 96 研究報告書

平成 8 年 11 月 30 日

広島大学原医研分子病理 丹羽太貴

研究課題：放射線で誘発される遺伝的不安定性の解析

研究の目的

従来より放射線は DNA 損傷を誘発し、それが突然変異の直接の原因になると考えられている。しかしながら最近の研究から、放射線は細胞に遺伝的不安定性を誘導し、その結果として突然変異が生じる可能性が明らかになりつつある。このような放射線による遺伝的不安定性の実体とそれが引き起こす突然変異の種類は、遺伝学のみならず発がんを考える上で重

要な課題である。

本研究は、放射線により誘導された遺伝的不安定性の結果として 2 次的に誘発された突然変異の実体とその機構を解明することを目的とする。このため、照射された雄親より生まれた F1 マウスにおけるミニサテライト配列の突然変異について解析する。さらに突然変異検出用プラスミッドを作成し、これを導入したマウス培養細胞に放射線を照射して、誘導される突然変異を解析する。

材料と方法

1. 放射線誘発生殖細胞突然変異の解析

C3H/HeN 系統と C57BL/6N 系統マウスを用いた。まず雄マウスに各種放射線を照射し、非照射雌マウスと交配した。交配の時期は、照射直後、照射後 2 週後、照射後 10 週後に行った。これによりそれぞれ、精子期、精細胞期、精原細胞期、にたいする放射線の影響を明らかにすることができる。照射は、 ^{60}Co - 線と ^{252}Cf 中性子線について行った。 ^{252}Cf 線源よりの放射線は、35%の 線と 65%の中性子線よりなっている。以上の交配より生まれた F1 マウスより DNA を抽出し、制限酵素 *Hae*III で消化の後、ミニサテライト遺伝子座 Ms6hm についての Southern 法による解析を行った。今回の解析の対象の C3H 由来アレルは 3.7kb、C57BL 由来アレルは 8.3Kb のバンドとして検出できた。突然変異の判定は、Southern 法により検出されたミニサテライトのバンドの長さが両親アレルの距離より 2% 以上変化したものを変異個体とした。

2. 相同組換え検出用レポータープラスミッドの作成

相同組換え検出用プラスミッドの構造を図 1 に示す。このプラスミッドでは、図にあるように neomycin 耐性遺伝子中の *Eco*521 と *Ba*11 部位が重複して存在し、さらに重複部位の間に各種の spacer 配列がある。このため、neomycin 耐性遺伝子の機能は破壊されている。このプラスミッドを導入した細胞で重複部位の相同組換えが生じると、Spacer 配列が除かれて neomycin 耐性遺伝子の機能が回復することが期待できる。

結果

1. 放射線誘発生殖細胞突然変異の解析

^{60}Co - 線によるマウスミニサテライト配列の生殖細胞突然変異を、図 2 に示す。これより明らかであるが、Ms6hm 遺伝子座の自然突然変異率は大変高く、1 非照射雄より生まれた F1 マウスでは、雄由来アレルの突然変異率が 9.1%、雌由来アレルの突然変異率が 12%であった。雄の照射によりこの突然変異率はさらに上昇する。そして、精細胞期照射が最も高い感受性を示した。すなわち精細胞期照射による雄由来アレルの突然変異率は、1Gy で 22%、12Gy で 28%、30y で 28%であった。これにたいして、精細胞期照射では雌由来アレルの突然変異率は変化しなかった。精子期と精原細胞期の感受性は、精細胞期にくらべて低かった。3Gy の精原細胞期照射により雄由来アレルの突然変異率は 16%に上昇した。この場合の雌由来アレルの突然変異率は 7.3%であった。3Gy の精子期照射では、

雄由来アレルの突然変異率は 14%であったが、雌由来アレルの突然変異率も 15%と高い傾向にあった。²⁵²Cf 中性子線の照射も同様に行った。上記の ⁶⁰Co - 線で明らかになったように、雄マウスの照射による F1 マウスでの突然変異は、主に雄由来のアレルで生じている。そのため中性子線の実験では雄由来のアレルのみについて判定を行った。図 3 はその結果であり、比較のため ⁶⁰Co - 線の結果も示してある。図より明らかであるが、非照射群における自然突然変異率は 8.4%であった。中性子線によるミニサテライト配列の突然変異誘発についても、精細胞期が最も感受性が高く 0.35Gy で 18%、0.7Gy で 26%、1.02Gy で 24%であった。次いで精原細胞期が感受性が高く、精子期は最も感受性が低かった。ミニサテライト配列の突然変異率は、1.02Gy の中性子線で精原細胞期照射において 19%、精子期照射において 16%であった。これらの結果より、ミニサテライト配列の突然変異誘発は、線より中性子線の方が効率が良かった。

2. 精子期照射により生まれた F1 マウスにおける母親由来アレルの突然変異

3Gy の 線を精子期に照射して得た F1 では、父親由来のみならず母親由来の Ms6hm 遺伝子座の突然変異頻度も上昇する傾向があったので、これを確認するため雄マウスにさらに高い 6Gy の 線を照射して生まれた F1 を解析した。雌由来アレルの突然変異については、まず雄マウスとして C57BL 系統を用いてこれに照射し、C3H 雌マウスに交配して生まれた F1 マウスについて C3H 由来アレルの突然変異を解析した。さらに対照実験としては、雄マウスとして C3H 系統を用いて照射し C57BL 雌マウスに交配の後、得られた F1 マウスの C3H 由来アレルの突然変異を解析した。

得られた実験結果を表 1 に示す。非照射 C3H 雄マウスと C57BL 雌マウスの交配で得られた F1 マウスにおける C3H 由来 Ms6hm 遺伝子座の突然変異頻度は 8.4%であった。これにたいして雄 C3H マウスの精子期に 6Gy の 線を照射して生まれた F1 マウスでは、突然変異頻度が 22%に上昇していた。さらに、精原細胞期に 6Gy の照射を行ったものでは、やはり 19%に上昇していた。一方、非照射 C57BL 雄マウスと C3H 雌マウスの交配で生まれた F1 マウスにおける雌 C3H 由来 Ms6hm 遺伝子座の突然変異は、9.8%であった。精子期に 6Gy を照射した雄 C57BL マウスとの交配では、雌親由来アレルの突然変異頻度は 20%に上昇していた。精原細胞期に 6Gy を照射した場合、雌親由来 Ms6hm 遺伝子座の突然変異頻度は 10%で、非照射群における値と差は無かった。

3. 相同組換え検出用レポータープラスミッドの作成

図 1 に示した相同組換え検出用レポータープラスミッドは現在作成をほぼ終了したが、現在これを培養細胞に導入して検討を開始している。

考察

本研究では、まずミニサテライト遺伝子座の生殖細胞突然変異が、線により高い頻度で誘発されることが明らかにされた。この突然変異率は精細胞期照射において最も高く、1Gy の線量で 10%もの増加をみる。1Gy で期待される DNA の単鎖切断は 3000kb に 1 個である。

一方 Ms6hm 遺伝子座の大きさは 3kb である。ミニサテライト遺伝子座の突然変異が DNA 損傷のために生じたとすると、期待される突然変異率は 10^{-3} である。それゆえ、10%にも及ぶ突然変異率は、DNA 損傷の数からは説明できない。このため、ミニサテライト Ms6hm 遺伝子座における放射線誘発突然変異は、放射線が直接個の遺伝子座に作用したのではなく、放射線により生殖細胞内に遺伝的不安定性が誘導され、その結果 2 次的に生じたものと考えられる。 ^{252}Cf 線源よりの放射線は、35%の γ 線と 65%の中性子線よりなっている。この両方の放射線が相加的に働くと仮定して、Ms6hm 遺伝子座の突然変異の誘発の RBE を計算することができる。このような計算の結果から、 ^{252}Cf 中性子線の RBE は精子期照射、精細胞期照射、精原細胞期照射、でのおおの 5.9、2.6、6.5、であった。Ms6hm 遺伝子座の突然変異に見られるような放射線による遺伝的不安定性の誘導が細胞内に放射線により生じたラジカルによるものか、それとも放射線による DNA 損傷によるものか、は重要な問題である。一定の線量の放射線は線質に関わらず同じ数のラジカルを誘発する。これに対して、DNA 損傷でもとりわけ 2 本鎖切断は中性子線のほうが誘発効率がよい。 ^{252}Cf 中性子線による Ms6hm 遺伝子座の突然変異誘発が高い RBE を持っていたことは、遺伝的不安定性の誘導に DNA2 本鎖切断のような損傷が関与していることを物語っている。

本研究で検討したミニサテライト配列の突然変異が、放射線による DNA 損傷の直接の結果ではなく、遺伝的不安定性誘導の 2 次的な産物であることを決定的に支持するものとして、雄精子期照射による雌側アレルの突然変異がある。表 1 にまとめた結果より、精子期に 6Gy を照射した雄 C57BL より生まれた F1 マウスにおける雌 C3H 由来 Ms6hm 遺伝子座の突然変異頻度は、非照射群の 8.4%に対して 20%と統計的にも有意な上昇を示していた。この頻度の上昇の程度は、雄 C3H に 6Gy を照射した場合の F1 での C3H 由来アレルに匹敵するものであった。照射雄から生まれた F1 での雌アレルの突然変異頻度の上昇は、精原細胞期の照射ではみられず、精子期照射に特徴的なものであった。これより、照射された精子による DNA 損傷の卵への持ち込みにより、1 受精卵で遺伝的不安定性が誘導され、これが雌由来の Ms6hm 遺伝子座に 2 次的に作用して突然変異を誘発したものと考えられる。

相同組換え検出用レポータープラスミッドの pSV2neo EB2 は、pSV2neo プラスミッドを基本にして、このプラスミッドの Eco521 と Ba11 部位を重複して持っており、この間に適当な spacer 配列が挿入された形になっている。重複部位同士の相同組換えが生じるともとの pSV2neo プラスミッドに変化して、neomycin 耐性遺伝子が発現しうる形となる。

図 1 相同組換え検出用レポータープラスミッド

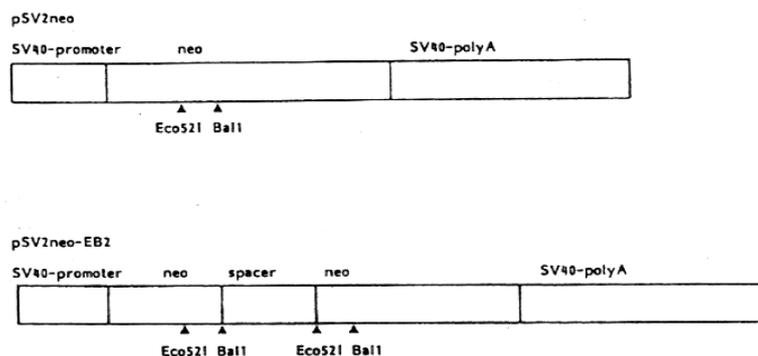


図2 Ms6hm 遺伝子座生殖細胞突然変異のγ線による誘発

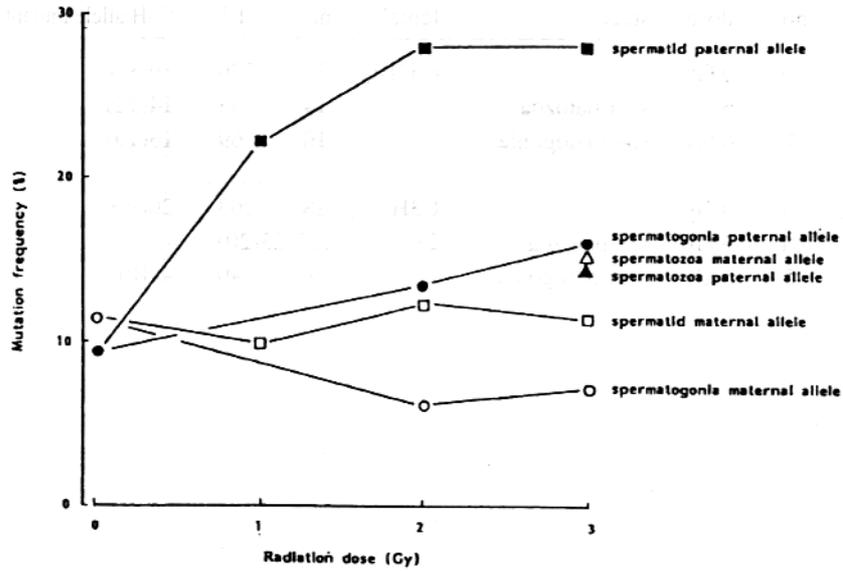


図3 Ms6hm 遺伝子座生殖細胞突然変異の²⁵²Cf放射線による誘発

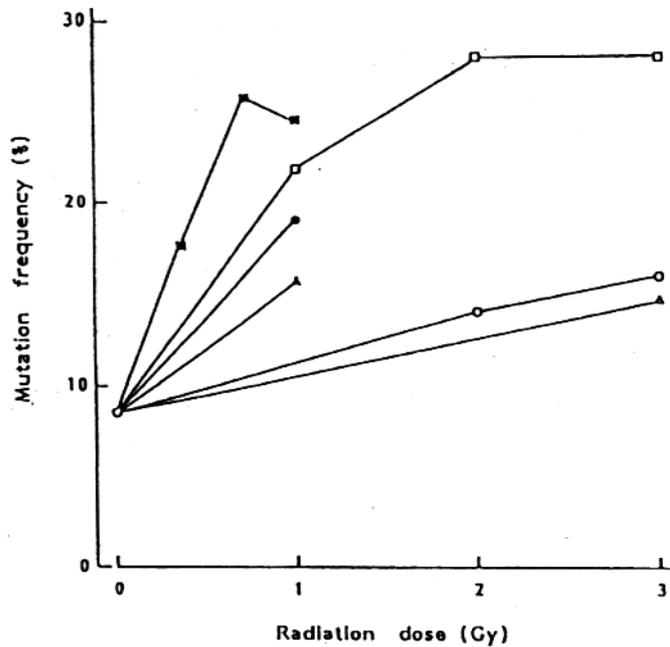


表1 6 Gy照射された雄親より生まれたF1マウスにおけるC3Hアレルの突然変異

male	no.	dose	stage	female	no.	F1	C3H allele mutants(%)
C3H	23	0 Gy		C57BL	35	226	19(8.4)
	8	6 Gy	spermatozoa		14	63	14(22)
	7	6 Gy	spermatogonia		10	69	13(19)
C57BL	27	0 Gy		C3H	28	203	20(9.8)
	21	6 Gy	spermatozoa		28	117	23(20)
	5	6 Gy	spermatogonia		9	40	4(10)

分担課題報告書（5）鈴木啓司

新技術事業団財団プロジェクト 96

細胞癌化過程におけるテロメラーズ制御機構の役割解明

分担研究者：長崎大学薬学部放射線生命科学教室 鈴木啓司

研究協力者：長崎大学薬学部放射線生命科学教室 児玉靖司

長崎大学薬学部放射線生命科学教室 三浦ミカ

長崎大学薬学部放射線生命科学教室 楊 治

長崎大学薬学部放射線生命科学教室 渡邊正己

【研究目的】

細胞の癌化過程において染色体テロメア構造の変化が重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。ヒト細胞のテロメアは、TTAGGG の 6 つの塩基の単純繰り返し構造からなり、細胞分裂につれて次第に削られ、ある長さ以下になると細胞分裂を止める。生殖細胞など無限増殖能を持つ一部の細胞は、テロメア構造を再構築するためにテロメア合成酵素（テロメラーズ）を持つが、大部分の体細胞では、その機能が失われているか厳しく制御されているため寿命は有限である。しかし、細胞は、何等かの原因でテロメラーズ活性を獲得すると不死化あるいは癌化すると予想されている。最近、その酵素活性の鋭敏な検出法（TRAP法）が開発され、1）ヒト組織では、正常組織及び癌組織以外は陰性である。2）癌組織の約 90%は陽性である。3）培養細胞では、正常体細胞は陰性であるが、多くの不死化細胞は陽性である等の事実が報告されている。これらの事実は、1）テロメラーズが体細胞の分化過程で不活性化されること、また、2）発癌過程にテロメラーズ再活性化が深く関与していることを示唆している。

一方、我々の研究では、これまでにこのテロメラーズ活性が動物種によって大きく異なることを発見した。同じ発生時期にある胎児由来細胞で比較すると、実験的に癌化しやすいマウスやハムスターのテロメラーズ活性は、ヒト細胞に比べて極めて高い。さらに、興味深いことに、54 種のヒト胎児細胞を調査した予備的結果では、ヒト集団にかなりの高い頻度（10%以上）で体細胞におけるテロメラーズ活性が高い個体が存在し、細胞レベルでその活性を長期間維持する可能性が示唆された。これらの個体は、マウスと同様、発癌感受性が高いだろうか？多いに疑問である。そこで本研究では、ヒト細胞における 1）細胞分化過程におけるテロメラーズ不活性化機構、及び 2）発癌過程におけるテロメラーズ再活性化機構について明らかにし、ヒト個々人の発癌感受性の推定が可能か否かを検証することを目的として行うものである。

【研究方法】

(1) 未分化細胞の培養系における不死化頻度とテロメラーズ活性の関係

材料として、ヒト全胎児細胞（7~9 週齢）、マウス全胎児細胞（12~13 週齢）、及びシ

リアンハムスター全胎児細胞（12～13 週齢）を用いた。これらの細胞は、いずれもテロメラーゼ活性陽性細胞を含んでいる。そこで、これらの細胞を継代培養し細胞分裂に伴うテロメラーゼ活性、及びテロメア DNA の長さの変化をそれぞれ調べた。継代培養により、ヒト細胞はほぼ 100% 老化し、逆にマウス細胞はほぼ 100% 不死化する。シリアンハムスター細胞は、稀に（10% 弱）不死化する。こうした細胞不死化頻度の違いをテロメラーゼ制御機構の相違で説明可能か否かについて検討する。

（2）癌の悪性度とテロメラーゼ活性の関係

多段階発癌過程のどの時期にテロメラーゼ再活性化現象が誘起されるのかを探ることは極めて重要なことである。これまで得られている情報では、テロメラーゼ活性は癌の進展度からみるとかなり早期に陽性になっている可能性が高い。こうした現象が白血病も含めて種々の固形癌で普遍的にみられる現象であるかを確かめる。これが確証されれば、癌の早期診断としてのテロメラーゼ活性測定の有効性が保証されることになる。また、癌治療法の基礎研究として、テロメラーゼ RNA に対するアンチセンス RNA を癌細胞に導入することにより、癌細胞の分裂能力を消失させる実験も試みる。

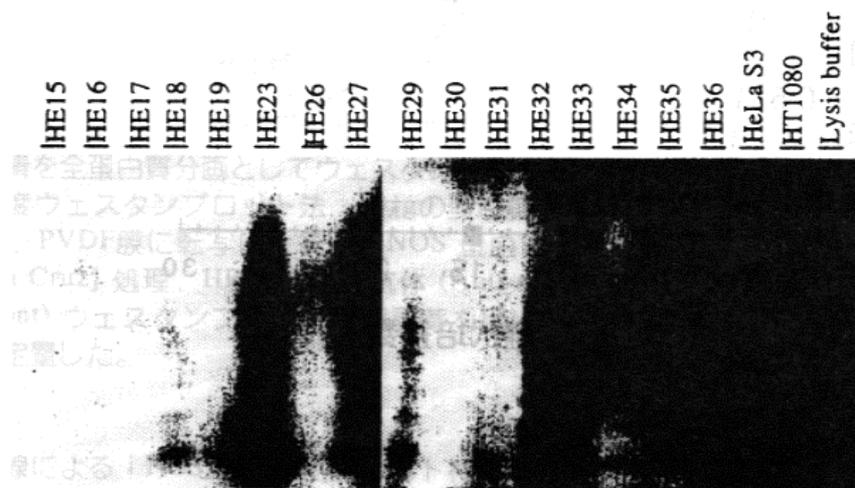
【結果】

（1）未分化細胞の培養系における不死化頻度とテロメラーゼ活性の関係

ヒト 7 - 9 週齢胎児とほぼ同程度の発生段階にあるマウス、ラットおよびハムスターの胎児から細胞を分離し、テロメラーゼ活性を測定したところ、いずれの細胞でも陽性対象細胞として利用しているヒト癌細胞（HT1080）と同程度の活性が認められた。

しかし、24 種類のヒト胎児細胞のテロメラーゼ活性を測定したところ、図 1 に示すように

図1 各種ヒト胎児由来細胞のテロメラーゼ活性

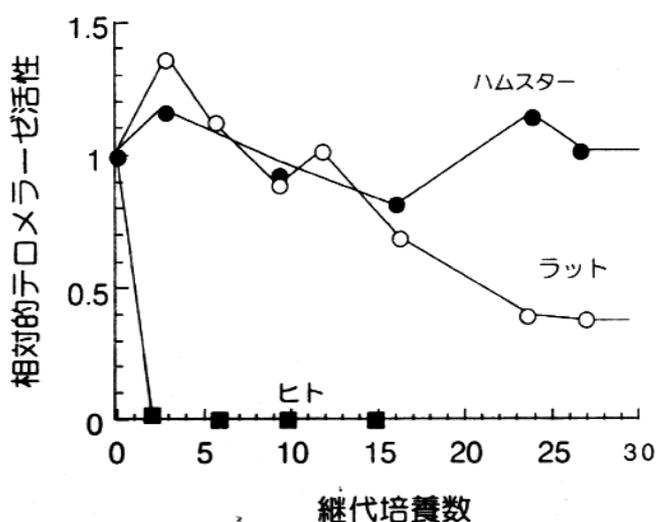


Telomerase activity in HE cells. The TRAP method(Kim et al.,1994) for telomerase activity was used, as described with some minor modification. Cell lysates were prepared from 10^5 cells using the 0.5% CHAPS detergent lysis method and the equivalent of 10^3 cells was used in each assay. The assay uses PCR to amplify the products of telomerase catalyzed extension of an oligonucleotide prime. Telomerase activity results in a 6 bp ladder when the PCR products are electrophoresed on a 10% polyacrylamide non-denaturing gel.

表1 各種ヒト胎児由来細胞のテロメラーゼ活性

Telomerase Activity	Cellular Strains of HE	Rate(%)
Negative (n=28)	HE 4, 6, 7, 8, 10, 11 HE 12, 13, 15, 16, 17, 19 HE 26, 30, 31, 35, 36, 37 HE 46, 48, 49, 50, 51, 52 HE 53, 54, 55, 57	68.29
Weak Positive (n=12)	HE 18, 27, 29, 32, 33, 34 HE 38, 39, 40, 41, 42, 47	29.27
Positive (n=1)	HE 23	2.44

図2 試験管内における継代培養に伴うテロメラーゼ活性の変化



活性にかなりのばらつきがあるが、およそ 30%の個体にテロメラーゼ活性が認められた(表1)。これらの結果は、未分化の胎児細胞では、動物種によらずテロメラーゼ活性が存在することを意味している。

ついでこれらの細胞を試験管内で培養し、継代数の増加に伴うテロメラーゼ活性の変化を調べた。結果を図2に示す。

その結果、ハムスターやラットでは、15 - 20 継代で最低活性になるものの、ハムスター細胞では胎児細胞の 80%、ラット細胞では胎児細胞の 30%程度の活性を維持する。しかし、ヒト細胞(HE23 および 40)では、いずれも継代培養の早い時期に活性を失ってしまうようである。ヒト細胞の結果については、現在さらに追試を行っている。

ヒト細胞と齧歯類細胞の不活化頻度が大きく異なることの原因は、現在のところ不明であるが、ヒト細胞は、試験管内で培養することによって急速にテロメラーゼ活性を失うことが、試験管内実験系でマウスやハムスターなど齧歯類動物由来の体細胞に比べがん化しにくい原因である可能性がある。今後、ヒトと齧歯類細胞における分化に伴うテロメラーゼ活性制御機構の相違が明らかになれば、不活化頻度が異なることへの解答のひとつの糸口となると期待できる。このことはまた、細胞癌化機構におけるテロメラーゼ再活性化の役割を解明する

ことにつながる。いっぽう、癌の進展度とテロメラーゼ活性との関連性が明確にできれば、テロメラーゼ活性は極めて有効な診断の指標と成り得る。

(2) 癌の悪性度とテロメラーゼ活性の関係

マウス、ハムスター胎児由来細胞を放射線などでがん化させた 7 細胞 (マウス m5s、SHE S21-26) のテロメラーゼ活性は、胎児から採集直後の細胞のそれと同程度以上に高いことが判った。また、ヒト癌細胞も現在までに解析したもの (HeLa S3, HT1080, RKO) は例外なく、テロメラーゼ活性が高いことがわかった。がん細胞は、例外なくテロメラーゼ活性が高いという結果は、細胞の不死化あるいは、がん化とテロメラーゼ活性に密接な関係があることを示唆している。

【今後の課題】

今年度の研究結果は、いずれもテロメラーゼ活性とがん形質の発現がかなり密接に関連したものである可能性を示唆している。結果は、テロメラーゼ活性は、未分化の胎児細胞には、動物種の違いによらず高い活性を保持しているが試験管内で培養することによって失われてゆくことを支持している。ヒト細胞では、失活が培養の早い時期に起きるが、齧歯類動物細胞では、その失活のスピードが緩やかであることが判った。しかし、現時点では、まだ、多段階発癌過程のどの時期にテロメラーゼ再活性化現象が誘起されるのかを断定できていない。ヒト細胞と齧歯類細胞の不死化頻度が大きく異なることの原因は、現在のところ不明である。しかし、両細胞間における分化に伴うテロメラーゼ活性制御機構の相違が明らかになれば、不死化頻度が異なることへの解答のひとつの糸口となる。このことはまだ、細胞癌化機構におけるテロメラーゼ再活性化の役割を解明することにつながる。

我々の結果を含めて、これまで得られている情報では、テロメラーゼ活性は、癌の進展度からみるとかなり早期に陽性になっている可能性が高い。今後、こうした現象が白血病も含めて種々の固形癌で普遍的にみられる現象であるかを幅広く確かめる。また、癌の進展度とテロメラーゼ活性との関連性が明確にできれば、テロメラーゼ活性は極めて有効ながん診断の指標と成り得る。このことが検証されれば、癌の早期診断法としてのテロメラーゼ活性測定の有効性が保証されることになる。また、癌治療法の基礎研究として、テロメラーゼ RNA に対するアンチセンス RNA を癌細胞に導入することにより、癌細胞の分裂能力を消失させる実験も試みる予定である。テロメラーゼ RNA を標的としたアンチセンス RNA 法は、極めて特異性の高い癌治療法と成り得ることが期待される。

温熱・放射線による Nitric Oxide Synthase (NOS) の誘導

福井医科大学放射線基礎医学講座 加納永一

【導入と目的】

環境要因の変化に伴い細胞は様々な様式で自己防衛的応答を示す。これがいわゆるストレス応答であり、hsps の発現誘導、癌遺伝子・癌抑制遺伝子の発現誘導および発現抑制、サイトカインの放出誘導等の様々な現象が見られる。ストレス応答の結果、NO 合成酵素 [nitric oxide synthase (NOS)] が誘導されると多量の NO が細胞内に産生され、ニトロソアミンの生体内生成・NO 化合物による DNA 損傷の誘発等が二次的に起こり、細胞を発癌の過程へ導くと考えられる。この誘導型 NO 合成酵素【Inducible NOS (iNOS)】の細胞内蓄積に着目し、温熱・放射線による誘導型 NOS2 の細胞内蓄積の動態を高感度ウェスタンブロット法を用いて検討した。

【材料と方法】

1. 細胞：ヒト神経膠芽腫細胞 A 172 および T98G を 10%FBS を含む Dulbecco , s MEM で培養し、実験に用いた。
2. 温熱処理：細胞培養用フラスコ内に播種した上記細胞をフラスコごと 44 に設定した恒温槽へ 15~20 分間浸漬して行った。
3. 放射線照射：細胞培養用フラスコ内に播種した上記細胞に X 線発生装置 (HW 150 , HITEX 社製) を用いて約 1.0Gy/min の線量率で、2~4Gy 照射した。
4. 放射線/温熱併用処理：細胞培養用フラスコ内に播種した上記細胞に X 線発生装置をもちいて X 線照射した後、直ちに 44 に設定した恒温槽へ浸漬して温熱処理を行った。
5. 全蛋白質分画の調製：各処理後経時的に細胞を回収し、界面活性剤 (NP 40 , Deoxycholate , SDS) を含む Buffer 中で 3 回凍結融解を繰り返し、遠心によって得られた上清を全蛋白質分画としてウェスタンブロットに用いた。
6. 高感度ウェスタンブロット法：40ug の蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、PVDF 膜に転写した後、iNOS 蛋白質に対する 1 次抗体【Anti NOS2 (N 20) , Santa Cruz】処理、HRP 結合 2 次抗体 (Anti rabbit IgG HRP) 処理を施し、BLAST (DuPont) ウェスタンブロット増感試薬を用いて 4・クロロナフトールを基質として発色・定量した。

【結果】

1. 放射線による iNOS の蓄積誘導：ヒト神経膠芽腫 A 172 細胞においては放射線による iNOS の顕著な蓄積誘導は見られなかったが、T98G 細胞においては照射 6 時間後に iNOS の蓄積が認められ、そのレベルは 24 時間目まで維持された。
2. 温熱による iNOS の蓄積誘導：A 172 細胞においては照射 24 時間後に僅かな蓄積が認

められた。T98G 細胞においては照射 3 時間後から iNOS の蓄積が認められ、24 時間目まで徐々にそのレベルは上昇した。

3. 放射線/温熱併用処理による iNOS の蓄積誘導：A 172 細胞においては併用処理による iNOS の減少が見られた。一方 T98G 細胞においては併用処理により蓄積誘導される時間の遅延が見られたものの、放射線単独処理での誘導レベル以上（相加的レベル）の蓄積が照射 12 および 24 時間後に観察された。

【考察】

同一細胞（神経膠細胞）由来の 2 種類の癌細胞を用いて放射線および温熱による iNOS の細胞内蓄積について検討した。2 種類の癌細胞（A 172 および T98G）において放射線および温熱に対する応答様式が異なることが明らかになった。これは放射線・温熱が直接 iNOS の発現誘導に作用しているのではなく間接的に作用していることを示唆するものと考えられる。iNOS の発現はサイトカインや NFκB により誘導されることが明らかにされており、細胞によりこれらの誘導動態が異なる現象を反映しているものと考えられる。

各種ストレスで誘導される細胞内タンパクの分離と精製、およびその遺伝子不安定性誘導における意義の解明

金沢大学薬学部分子細胞薬学講座 二階堂修

[研究目的]

各種ストレスに対する様々な細胞応答が知られているが、細胞周期のチェックポイントやアポトーシスは遺伝子不安定性誘導の抑制に働く重要な機構である。すなわち、放射線照射などのストレスを受けた細胞において、前者は細胞に修復の時間を与え、後者は遺伝子不安定性を誘導しうる潜在的細胞を未然に個体から葬り去る。特にアポトーシスは、多細胞生物ゆえに存在する特徴的な細胞応答であり、個体、組織レベルの調節（防御）を考える上で極めて興味深い。癌抑制遺伝子である p53 はその両機構において鍵となるタンパクであり、この p53 を機能的に失うと細胞は遺伝子の不安定性誘導を加速することか知られている。アポトーシスにおける p53 の役割も次第に明らかにされつつあるが、アポトーシスのシグナル伝達は極めて複雑でかつ多岐にわたっており、この機構全容の解明はまだ遠い。本研究では、放射線誘発アポトーシスに高感受性のマウス胸腺リンパ腫細胞を用い、放射線誘発アポトーシスに参与するタンパクおよび遺伝子を同定することを目指し、これらの因子の遺伝子不安定性誘導における役割を明らかにすることを目的とする。

[研究成果]

1) 放射線などのストレスによるアポトーシス誘導に参与するタンパクの分離精製とその機能解析

放射線誘発アポトーシスに高感受性を示すマウス胸腺リンパ腫由来 3SB 細胞 (Oyama et al: 1992) に突然変異剤 (EMS) を処理し、 \times 線で選択することにより、放射線誘発アポトーシスに対して抵抗性を示す突然変異体を 12 クローン分離した (図 1)。そのうち最も抵抗性を示した 1B1 細胞を再度クローニングし、さらに安定な 2 次クローン 1B104 細胞を得た。エリスロシン B 染色を指標にして、放射線、あるいは紫外線によるアポトーシス誘発能を比較したところ (図 2)、この 1B104 細胞は放射線誘発アポトーシスに対して顕著な抵抗性を示すことが明らかとなった。この細胞における p53 遺伝子の変異を解析したところ、DNA 結合ドメインで点突然変異が検出され、実際にゲルシフト解析でも配列特異的 DNA 結合能の消失が確認された。したがって、この p53 の変異が 1B104 細胞のアポトーシス抵抗性獲得の原因 (の一つ) であることが示唆された。現在、残り 11 種の抵抗性細胞について p53 の変異を解析中であるが、p53 に全く変異の見られない抵抗性細胞も存在する可能性があり、p53 以外のアポトーシス関連タンパクの変異がこのアポトーシス抵抗性に参与しているものと期待される。

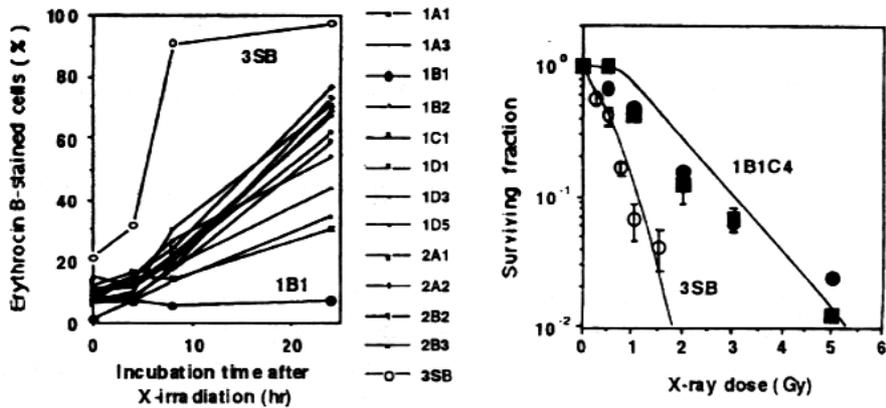


図1 放射線誘発アポトーシス抵抗性細胞 (1B1C4) の樹立

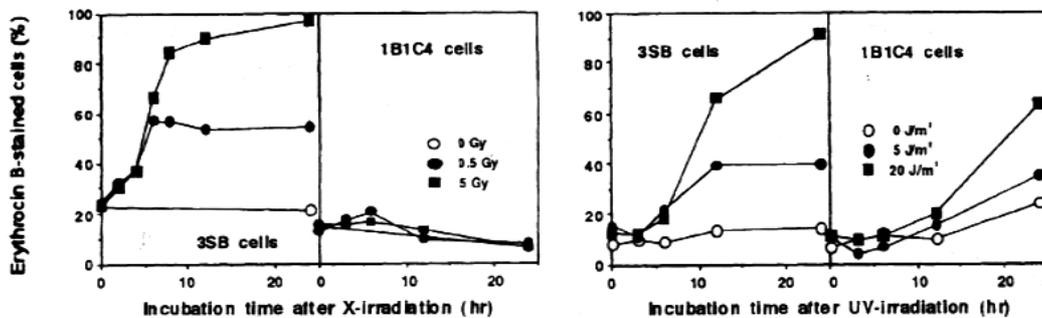


図2 放射線、あるいは紫外線誘発アポトーシスに対する感受性

2) 放射線などのストレスにより誘発されるアポトーシスに伴う細胞表面の変化を識別できる抗体の樹立

放射線誘発アポトーシスの機構解析の一助とするため、放射線照射によってアポトーシスを起こした細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体の樹立を試みた。放射線 (5Gy) を照射した 3SB 細胞でマウスを繰り返し免疫し、常法に従ってモノクローナル抗体を作製した。2 回のクローニングとスクリーニングの後、放射線照射した細胞とのみ反応し、未照射細胞とは反応しない 2 種類の抗体を得た。EPICS を用いて放射線照射後アポトーシスを起こした細胞と起こしていない細胞を区別すると、得られた抗体はアポトーシスを起こした細胞とのみ特異的に反応することが明らかとなった。今後、抗体の認識するエピトープを明らかにし、この分子の放射線誘発アポトーシス過程における役割について解析を行う予定である。

・正常、悪性 AT などいろんなヒト細胞で 1cGy で適応々答が見られる

J. Seong, C. O. Suh & G. E. Kim: Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 33: 869 - 874, 1995.

AT ホモ、ヘテロの lymphoblastoid 細胞、肝癌細胞、ヒト正常細胞何れでも 1cGy によって同じように適応々答が見られた。

- ・温熱、放射線によって iNOS の誘導が、同じヒト神経膠芽腫細胞で細胞系によって誘導のあるもの T98G とないもの A 172 がある (加納、1996)

3) 適応々答と in vitro transformation

- ・適応々答は m5S 細胞では突然変異はおさえるが transformation は促進する。
M . S . Sasaki : Int . J . Radh . Bio1 . 68 : 281-291, 1995.
- ・ C3H10T112 細胞では反対に transformation を抑える。
E . I . Azzam , G . P . Raphorst & R . E . J . Mitchel . Radiat . Res . 138 : 528-531, 1994 .

4) 低線量は spontaneous transformation や radiation-induced genetic instability を抑える

- ・ C3H10T1/2 の spontaneous transformation を 0 . 1、1 . 0cGy 24h culture でおさえる。
El . Azzam , S . M . de Toledo , G . P . Ralphofst & R . E . J . Mitchel : Radiat . Res . 146 : 369 - 373 , 1996 .
- ・ m5S 細胞で 2cGy の前照射が数 Gy による遺伝的不安定性の誘導を抑える。
渡辺正己ほか、High Levels of Natural Radiation 1996 in press.

[研究目的]

全体としてこのような生物反応の変動は Gy オーダーよりも cGy オーダーの方がより顕著であるように思える。即ち、cGy の放射線の作用は細胞の本来の性質、そのおかれた条件に著しく左右されると言えるのではなかろうか。従来ヒトの末梢リン巴球の適応々答については responder と non responder があると言われているが、その理由は今のところ不明である。

このような反応性の相違の原因は、ある程度は解明されるであろうが、微妙な環境要因も関与しているとすると、これが生物反応の本来の姿かも知れない。従って新しいモデルは、直線的な一連の過程の連続でなく、+、-とその中間を含めた確率論的な予測を基本とすべきであろうと結論される。